NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP CHITINASE CỦA CHỦNG NẤM *METARHIZIUM* SP. ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ XÁC CÔN TRÙNG TẠI THANH HÓA

Trịnh Thị Hồng[1]

TÓM TẮT

Nghiên cứu tiến hành với mục đích tìm ra chủng nấm có hoạt tính chitinase và điều kiện tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp chitinase làm cơ sở khoa học cho việc sản xuất chế phẩm chitinase ứng dụng trong thực tiễn. Metarhizium sp. có hoạt tính chitinase cao nhất trong 12 chủng nấm được phân lập tại Thanh Hóa. Các điều kiện nuôi cấy thích hợp sự sinh tổng hợp chitinase đã được tối ưu trong môi trường bán rắn ở nhiệt độ 32^{0}C, pH 5,5, hàm lượng chitin trong môi trường 12% được nuôi trong 144 giờ.

Từ khóa: *Metarhizium sp., chitinase, chitin.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitin là một polysaccharide chiếm 22% - 60% trọng lượng khô của lớp vỏ côn trùng. Chitin khó bị phân hủy bởi các enzyme tiêu hóa của động vật nhưng dễ bị phân hủy bởi chitinase của vi sinh vật. Hiện nay, có rất nhiều công trình nghiên cứu chitinase được tổng hợp từ vi sinh vật do tiềm năng ứng dụng to lớn của enzyme này trong nhiều lĩnh vực khác nhau như trong thu nhận tế bào trần (thể nguyên sinh), sản xuất chitooligosaccharides, glucosamine và N-acetyl glucosamine, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, trong việc kiểm soát nấm kí sinh trên cây trồng [1, 4].

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm *Metarhizium* sp. làm cơ sở khoa học cho việc tạo ra chế phẩm chitinase ứng dụng trong y học, xử lý môi trường và công tác bảo vệ thực vật hướng tới nền nông nghiệp sạch, bền vững.

2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Bột chitin.

Chủng nấm *Metarhizium* được phân lập từ xác côn trùng tại Thanh Hóa.

Môi trường nuôi cấy [1,2,4]

[1] *Giảng viên khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức*

Môi trường cao nấm men (Cao nấm men agar - Yeast Extract Agar (YEA)): Cao nấm men 4g, Agar 20g, Glucose 20g, nước 1000ml, pH = 5,5 - 6,0, khử trùng 1atm/30 phút.

Môi trường bán rắn: Trấu 50g, cám 40g, cao nấm men 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1g, $CaCl_2$ 0,1g, KCl 0,05g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,05g, bột chitin 10g, độ ẩm 60%. Sau khi hấp khử trùng, môi trường được chủng vào 1ml dịch huyền phù bào tử, điều chỉnh sao cho mật độ 106 bào tử/g môi trường và nuôi cấy ở nhiệt độ nghiên cứu. Độ ẩm môi trường nuôi cấy ban đầu được điều chỉnh bằng cách thay đổi thể tích nước cho vào.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1.2.1. Xác định khả năng tổng hợp chitinase bằng phương pháp nhỏ dịch [1, 7 ,8]

Cách tiến hành: Chuẩn bị môi trường thạch chitin, hấp khử trùng ở 121^0C trong 30 phút. Dùng các đĩa petri vô trùng (sấy ở 160^0C trong 120 phút) có kích thước bằng nhau, cho 20ml môi trường từ bình tam giác vào đĩa, để nguội, đục lỗ có đường kính 1cm, có thể đục 1 đến 3 lỗ trên đĩa petri. Cho 100µl dịch chiết enzyme vào 1 lỗ, đưa vào tủ lạnh từ 2 - 4h ở 5^0C, sau đó đưa sang tủ ấm ở 30^0C trong 24h, cho thuốc thử lugol vào, để 5 phút rồi đo kích thước vòng phân giải (D - d, cm), với D là đường kính vòng phân giải.

D-d ≥ 2,0cm: chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase mạnh.

1.0 ≤ D-d < 2,0cm: chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase trung bình.

D-d < 1,0cm: chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase yếu.

2.1.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy, nhiệt độ, nồng độ cơ chất (bột vỏ cua đồng) đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm Metarhizium sp [1, 7 ,8]

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh tổng hợp chitinase: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy bán rắn. Cấy các chủng nấm sợi. Thu dịch chiết enzyme tại các thời điểm sau nuôi cấy 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ, 144 giờ, 168 giờ. Xác định sự biến thiên hoạt tính chitinase theo thời gian nuôi cấy của các chủng nấm sợi nghiên cứu bằng phương pháp nhỏ giọt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh tổng hợp chitinase: Sử dụng môi trường bán rắn, nuôi cấy trong thời gian tối ưu đã khảo sát ở trên ở các nhiệt độ môi trường 20^OC, 25^0C, 30°C, 35^0C, 40^0C, 45°C. Tiến hành thu dịch chiết enzyme, xác định sự biến thiên hoạt tính chitinase bằng phương pháp nhỏ giọt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh tổng hợp chitinase: pH tối ưu được xác định bằng cách thực hiện phản ứng tại nhiệt độ tối ưu và sử dụng hệ đệm phù hợp như Britton và Robinson để điều chỉnh pH ở các mức 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0. Xác định hoạt tính chitinase bằng phương pháp nhỏ giọt và tìm ra pH tối ưu cho phản ứng enzyme.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (bột vỏ cua) đến quá trình sinh tổng hợp chitinase: Sử dụng môi trường bán rắn, lần lượt bổ sung bột vỏ cua ở các nồng độ 0,0%, 4%, 8%, 10%, 12%. Nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian tối ưu đã khảo sát. Tiến hành thu dịch chiết enzyme, xác định sự biến thiên hoạt tính chitinase bằng phương pháp nhỏ giọt.

2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

2.2.1. Chọn lọc chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase cao

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme chitinase của 12 chủng nấm sợi phân lập từ xác côn trùng tại Thanh Hóa được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính chitinase

STT	Chủng nấm	Kích thước vòng phân giải D-d (cm)	Mức độ hoạt tính
1	MT	2,3	Mạnh
2	SHTH 1.2.3	0,7	Yếu
3	SHTH 1.2.4	0,8	Yếu
4	F 6	0,0	Không hoạt tính
5	TQX 4.1	1,1	Trung bình
6	F 6.2	0,75	Yếu
7	F 1.4	0,7	Yếu
8	F 6.3	0,6	Yếu
9	TSS	1,35	Trung bình
10	TTH 1	1,4	Trung bình
11	F 1	0,1	Yếu
12	TTH 2	0,0	Không hoạt tính

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính chitinase phân chia theo mức độ

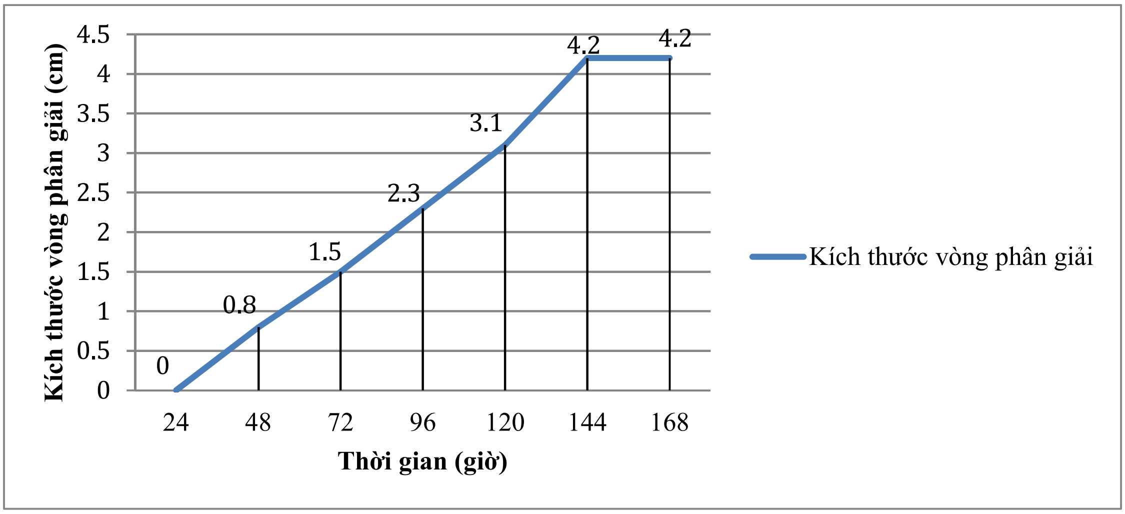
Mức độ	Số chủng nấm	Tỷ lệ (%)
Mạnh	1	8,33
Trung bình	3	25,00
Yếu	6	50,00
Không hoạt tính	2	16,67

Có 10/12 chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase, trong đó: 1 chủng nấm sợi có hoạt tính mạnh là MT chiếm 8,33%; 3 chủng nấm sợi có hoạt tính trung bình là TQX 4.1, TSS và TTH 1 chiếm 25,00%; 6 chủng nấm sợi có hoạt tính yếu là SHTH 1.2.3, SHTH 1.2.4, F 6.2, F 1.4, F 6.3, F 1 chiếm 50,00% và 2 chủng nấm sợi không có hoạt tính là F 6 và TTH 2 chiếm 16,67%. Chọn chủng nấm có hoạt tính mạnh, tiến hành định loại. Kết quả cho thấy đây là chủng nấm *Metarhizium* sp. và được chọn để nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy.

2.2.2. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của nấm sợi

Thời gian nuôi cấy nấm *Metarhizium* sp. tăng tỉ lệ thuận với hoạt tính chitinase được sinh ra. Sau 24 giờ nuôi hoạt tính chitinase thấp nhất (kích thước vòng phân giải = 0 cm), giá trị này tăng dần và đạt cao nhất tại thời điểm 144 giờ với kích thước vòng phân giải là 4,2cm, hoạt tính chitinase không tăng khi nuôi ở 168 giờ. Kết quả này cao hơn so với nấm

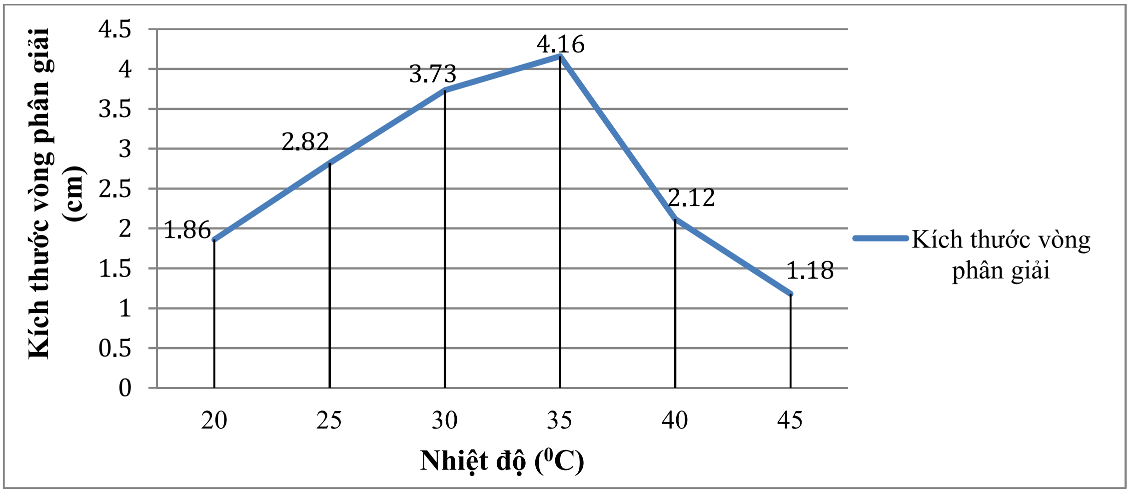
Aspergillus cho hoạt tính chitinase cao nhất khi nuôi cấy 36 giờ (Nguyễn Thị Hà - 2012), Lê Thị Huệ - 2010) và 96 giờ (Ghanem, Al-Makishah - 2010).



Hình 1. Kích thước vòng tròn phân giải của chitinase khảo sát trong 7 ngày

Mỗi loài có thời gian tăng trưởng tối ưu khác nhau, thường thì hoạt tính enzim mạnh nhất ở thời điểm bào tử mới bắt đầu hình thành (Dẫn theo Nguyễn Thị Hà, 2012). Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian càng tăng thì hoạt tính của enzyme cũng tăng, tiếp tục kéo dài thời gian nuôi cấy trong điều kiện môi trường không bổ sung thêm chất dinh dưỡng, hoạt tính chitinase giảm do quá trình sinh tổng hợp chitinase không xảy ra.

2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến quá trình sinh tổng hợp chitinase



Hình 2. Kích thước vòng phân giải khi thử hoạt tính của chitinase nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

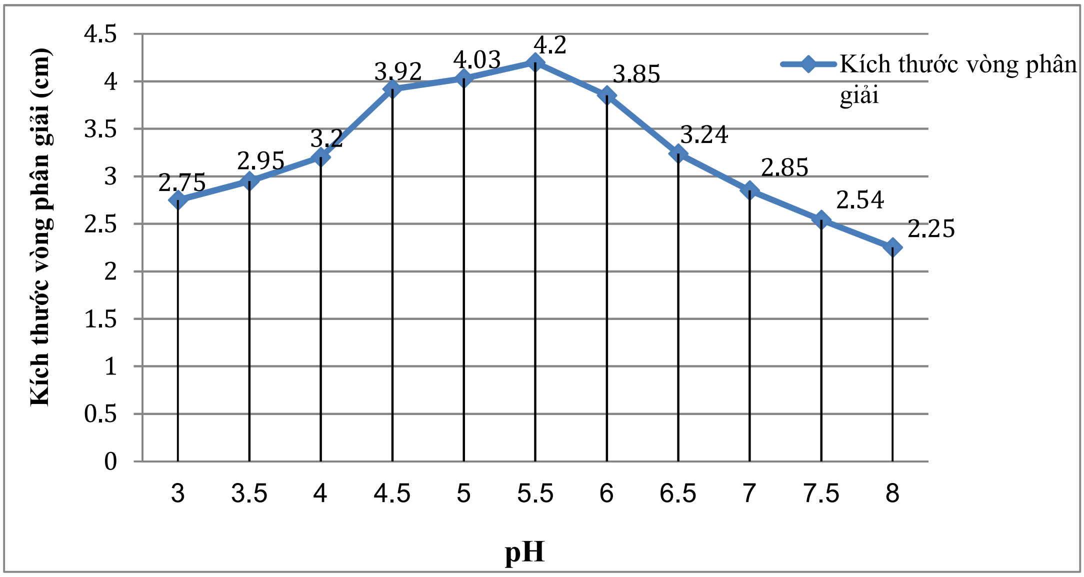
Khi nhiệt độ tăng thì hoạt tính chitinase cũng tăng và đạt giá trị cao nhất tại 35^0C với kích thước vòng phân giải 4,16cm. Tuy nhiên, giá trị này bị giảm khi tăng nhiệt độ lên 40^oC

và 45°C. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trên chủng nấm *Aspergillus* (Lê Thị Huệ, 2010 và Nguyễn Thị Hà, 2012).

Chủng nấm được phân lập tại Thanh Hóa sinh tổng hợp chitinase ở điều kiện nhiệt độ khá cao, tuy nhiên khi nhiệt độ lên cao hơn 35°C hoặc thấp hơn 25°C thì ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp của chủng nấm cho nên hoạt độ enzyme giảm. Mặt khác enzyme có bản chất là protein nên khi ở điều kiện nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp cũng ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính của enzyme.

2.2.4. Ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh tổng hợp chitinase

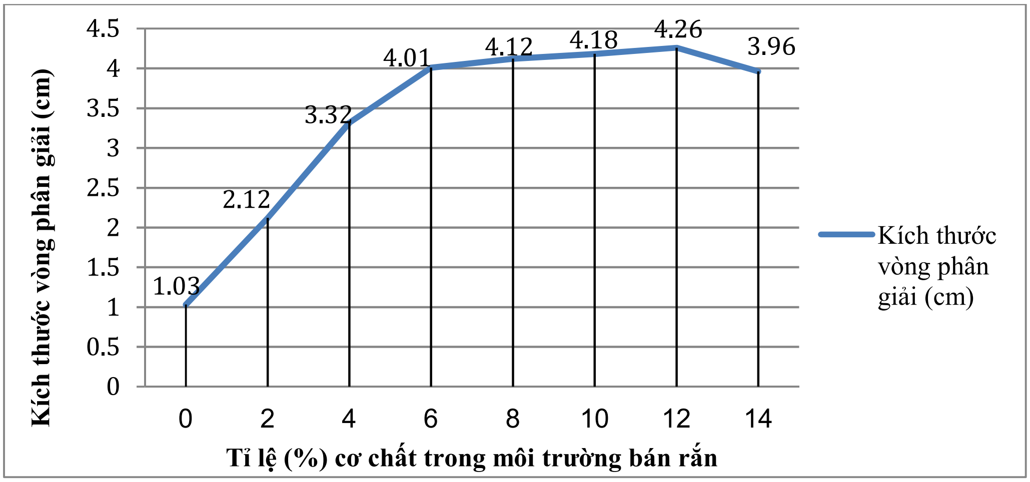
Dùng hệ đệm Britton và Robinson để điều chỉnh pH ở các mức 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8. Sau thời gian nuôi cấy thích hợp (144 giờ), thu dịch chiết enzyme. Lấy 1ml dịch enzym ủ với 1ml dung dịch chitin huyền phù 1% trong 30 phút ở nhiệt độ tối ưu 35^{0}C. Chitinase do chủng *Metarhizium* sp. sinh ra có hoạt tính chitinase cao nhất ở pH 5,5 với đường kính vòng phân giải là 4,2cm, hoạt tính chitinase giảm mạnh khi môi trường pH kiềm. Kết quả này tương tự như nghiên cứu trên chủng nấm *Aspergillus* (Nguyễn Thị Hà, 2012).



Hình 3. Kích thước vòng phân giải khi thử hoạt tính của chitinase ở các mức pH

2.2.5. Ảnh hưởng của tỉ lệ (%) cơ chất trong môi trường bán rắn đến quá trình sinh tổng hợp chitinase

Hoạt tính chitinase thấp nhất khi không có chitin trong môi trường và đạt giá trị cao nhất với kích thước vòng phân giải 4,26cm khi tăng 12% bột vỏ cua vào môi trường nuôi cấy, vượt quá tỉ lệ 12% hoạt độ chitinase có xu hướng giảm. Khi tăng nồng độ chitinase từ 0% - 6% thì kích thước vòng phân giải tăng 2,98cm; trong khi tăng nồng độ từ 6% - 12% thì kích thước vòng phân giải chỉ tăng 0,25cm. Như vậy, khi tăng nồng độ cơ chất vượt quá giới hạn tối ưu thì hoạt tính enzyme gần như không tăng (Lê Nguyễn Đoan Duy và nnk, 2014).



Hình 4. Kích thước vòng phân giải khi thử hoạt tính của chitinase ở các tỉ lệ (%) cơ chất khác nhau trong môi trường bán rắn

3. KẾT LUẬN

Tuyển chọn được chủng *Metarhizium* sp. có khả năng sinh tổng hợp chitinase cao nhất trong 12 chủng nấm đã được phân lập từ vỏ tôm và xác côn trùng.

Chủng nấm *Metarhizium* sp. được phân lập từ xác côn trùng có khả năng sinh tổng hợp chitinase cao trên môi trường nuôi cấy bán rắn với hàm lượng chitin 12%, thời gian nuôi cấy tối ưu là 144 giờ với pH 5,5, nhiệt độ 35^{0}C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Khưu Phương Yến Anh (2007), *Nghiên cứu khả năng sinh enzyme cellulase của một số chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ*. Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Sư phạm TP. Hồ Chí Minh.

[2] Nguyễn Lân Dũng và các tác giả khác (1976), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học (tập 2, tập 3)*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

[3] Lê Nguyễn Đoan Duy và nnk (2014), *Khảo sát quá trình sinh tổng hợp protease từ Aspergillus oryzae trên môi trường bán rắn,* Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, số 33, tr.104 - 109

[4] Nguyễn Thị Hà (2012), *Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng nấm Aspergillus protuberus sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ,* Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ :22b, tr.26-35.

[5] Lê Thị Huệ, (2010), *Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng NS thuộc giống Aspergillus, Trichoderma và ứng dụng*, Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Sư phạm TP. Hồ Chí Minh.

[6] Phạm Thị Lịch, Trần Thanh Thủy (2013). *Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy để thu nhận chế phẩm enzyme chitinase thô từ chủng nấm Trichoderma sp,* Tạp chí khoa học Đại học Sư phạm TP. Hồ Chí Minh, số 15, tr. 117 - 129.

[7] Lê Ngọc Tú và các tác giả khác (1982), *Enzym vi sinh vật (tập 1, tập 2)*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

[8] Trần Thanh Thủy (1998), *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật học*, Nxb. Giáo dục, Hà Nội.

[9] Ghanem, K. M., Al-Garni, S. M., & Al-Makishah, N. H. (2010), *Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by Aspergillus terreus*, African Journal of Biotechnology, 9(32), 5135-5146.

A STUDY ON THE AFFECTION OF A NUMBER OF FACTORS TO THE GENETIC CHITINASE OF THE VEGETATION MUSHROOM METARHIZIUM SP. DISTRIBUTED FROM INSECT REMAINS IN THANH HOA

Trinh Thi Hong

ABSTRACT

This research was conducted in order to find active chitinase strains and optimal conditions affecting the biosynthesis of chitinases which is the scientific foundation of producing chitinase preparations applied in practice. Metarhizium sp. contains the highest chitinase activity of 12 strains which are isolated in Thanh Hoa province. Optimal conditions for chitinase biosynthesis were optimized in semi-solid fermentation for 144 hours at 32^{o}C, pH 5,5, containing 12% of chitin.

Keywords: *Metarhizium sp., chitinase, chitin.*